

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Kateřina Tošovská

Stanovení biologické rozložitelnosti nových typů lehčených polyurethanů

Biodegradability assessment of new types of lightweight polyurethanes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Innemanová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji RNDr. Petře Innemanové, Ph.D. za její čas, který mi věnovala během tvorby mé bakalářské práce, podněty a inspiraci. Děkuji Mgr. Kateřině Jandové, Ph.D. za její pomoc spojenou s laboratorní činností. Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za jejich dlouhodobou podporu při studiu.

Abstrakt

Práce se zabývá biologickou rozložitelností (biodegradací) nových typů lehčených polyurethanů, které byly připraveny za účelem využití v zemědělské krajině. Rešeršní část shrnuje využití a principy biodegradace polyurethanů, dále je zpracován přehled standardizovaných metod pro kvantifikaci biodegradovatelnosti. Biodegradovatelnost materiálů byla laboratorně testována po dobu 150 dní pomocí respirometrie podle standardní normy D 5988. Celulóza (pozitivní kontrola) byla zmineralizována z $30,25 \pm 2,28$ %. Nejlépe rozložitelný materiál (PUR-B) byl zmineralizován z $9,73 \pm 1,95$ %. Postupem dle normy D 5988 došlo k podhodnocení výsledků. Pro správnou interpretaci výsledků se osvědčilo použití BaCl_2 , který stabilizoval absorbovaný CO_2 uvolněný respirací z degradovaných materiálů. Pro rychlé otestování biodegradovatelnosti nových materiálů byla navržena metoda využívající degradace za pomoci bakteriálního inokula v minerálním médiu. Dostupnost materiálů pro mikroorganismy byla měřena jako závislost optické density na čase. Nezdegradované části plastů představují potenciální riziko pro životní prostředí. Na teoretické úrovni byla zpracována problematika mikroplastů a možnosti jejich kvantifikace. Byla vybrána metoda pro kvantifikaci mikroplastů v mořských sedimentech, kterou by bylo s největší pravděpodobností možné použít pro kvantifikaci reziduí plastů po jejich biodegradaci v půdě.

Klíčová slova: biodegradace, polyurethany, nové typy lehčených polyurethanů, mikroplasty

Abstract

The subject of the bachelor thesis is biological degradation (biodegradation) of new types of lightweight polyurethanes which were synthesized for an agriculture application. The theoretical part summarises the utilization and biodegradation principles of polyurethanes and it outlines standardised methods for quantification of biodegradability potential. The biodegradability potential of the new materials was tested respirometrically according to the standard D 5988 under laboratory conditions for 150 days. Cellulose (the positive control) was mineralised of $30,25 \pm 2,28$ %. The best biodegradable material (PUR-B) was mineralised of $9,73 \pm 1,95$ %. According to the procedure described in the standard D 5988 our results were undervalued. Consequently absorbed CO_2 released from biodegradable materials was stabilised by reaction with BaCl_2 . The reaction is needed to interpret the results correctly. A screening method for a quick test of biodegradability was designed. It included biodegradation by bacterial inoculum in mineral medium. The availability of materials for microbial degradation was measured as a time-dependent function of optical density. The non-biodegradable residual particles of plastics represent a potential risk for the environment. The issue of microplastics and their quantification was processed theoretically. Methods for quantification of microplastics in marine sediment might be suitable for future application in soil conditions and measuring residual plastics formed after biodegradation.

Key words: biodegradation, polyurethanes, new types of lightweight polyurethanes, microplastics

Obsah

Seznam použitých zkratek	7
1 Úvod	8
2 Biologicky rozložitelné plasty	9
2.1 Vlastnosti polyurethanů a jejich využití	10
3 Biodegradace	11
3.1 Mechanismus biodegradace	12
3.2 Vliv aditiv na biodegradaci	13
3.3 Dostupné metody pro testování biodegradace	14
4 Experimentální část	16
4. 1 Charakteristika testovaných materiálů	17
4.2 Testování biodegradace nových typů lehčených polyurethanů dle normy D 5988	18
4.3 Screeningová metoda pro testování biodegradace nových typů lehčených polyurethanů	20
4.4 Výsledky	21
4.5 Diskuze	25
4.6 Závěr	26
5 Mikroplasty	26
5.1 Mikroplasty ve vztahu k půdě	27
5.2 Kvantifikace mikroplastů v životním prostředí	27
6 Závěry	32
Literatura	33
Přílohy	37

Seznam použitých zkratk

PUR – polyurethan

PBS – polybutylen sukcinát

PCL – polykaprolakton

PES – polyétersulfon

PHB – polyhydroxybutyrát

PLA – kyselina polymléčná

PE – polyethylen

NY 11 – Nylon 11

AcC – acetyl celulóza

PHA – polyhydroxyalkanoáty

R – uhlovodíkový řetězec

LDPE – nízkohustotní polyethylen

CMC – karboxymethylcelulóza

PUF/DS – polyurethanové pěny na bázi disacharidů

PUF – polyurethanové pěny

ASTM - American Society of the International Association for Testing and Materials

ISO - International Organization for Standardization

BOD – biochemical oxygen demand - biochemická spotřeba kyslíku

ThOD – theoretical oxygen demand - teoretická spotřeba kyslíku

PP – polypropylen

PCB – polychlorované bifenyly

DDE – dichlordifenyldichlorethylen

NP – nonylfenoly

PET – polyethylentereftalát

PA 6 – polyamid 6

ABS – akrylonitrilbutadienstyren

PC – polykarbonát

LLDPE – lineární nízkohustotní polyethylen

HDPE – vysokohustotní polyethylen

DBTDL – dibutylcín dilaurát (organocínový katalyzátor)

1 Úvod

Plasty (vysokomolekulární polymery s velmi heterogenním složením) jsou díky své široké škále vlastností masově využívány. Rok od roku jejich produkce neustále narůstá. Od roku 2004 vzrostla celosvětová produkce z 225 mil. tun na 311 mil. tun v roce 2014 (PlasticsEurope, 2015a). Polyurethany (PUR) jsou polymery, jejichž vlastnosti se mohou v závislosti na syntéze výrazně lišit (Dombrow, 1958). Heterogenní složení PUR přináší mnoho možností pro jejich využití. V roce 2013 tvořila produkce PUR v Evropské unii 7,4 % celkové produkce plastů (PlasticsEurope, 2015b).

Většina konvenčních plastů nepodléhá biologické rozložitelnosti (biodegradaci). Jejich akumulace v životním prostředí představuje riziko pro naši planetu. Jednou z možných strategií je výroba plastů s vysokým stupněm degradability. Degradaci za pomoci mikroorganismů (biodegradaci) podléhá velká část plastů vyrobených z obnovitelných zdrojů a také řada plastů syntetizovaných na ropné bázi (Tokiwa et al., 2009).

Pro biodegradaci je nezbytná prvotní fragmentace materiálu na nízkomolekulární části, které se tak stávají dostupné pro bioasimilaci pomocí mikroorganismů. Zvláštní skupinu plastů představují tzv. oxo-biodegradabilní plasty, u nichž je fragmentace většinou iniciována prooxidanty tvořenými přechodnými kovy (Scott, 2000).

Rozpadem větších částí plastů mohou vznikat malé fragmenty, tzv. mikroplasty. Jejich velikost nebyla zatím přesně definována, ale pohybuje se v řádech milimetrů (Cole et al., 2011). Schopnost adsorpce organických polutantů na povrchu plastů nebo vyluhování změkčovadel představují riziko pro potravní řetězec (Teuten et al., 2009). Výzkum se zatím soustředil na mikroplasty znečišťující marinní ekosystémy. Dosud nebyly publikovány studie týkající se koncentrace mikroplastů v půdách a v ovzduší a jejich vlivů na organismy spjatými s těmito složkami prostředí (Rocha-Santos et al., 2015).

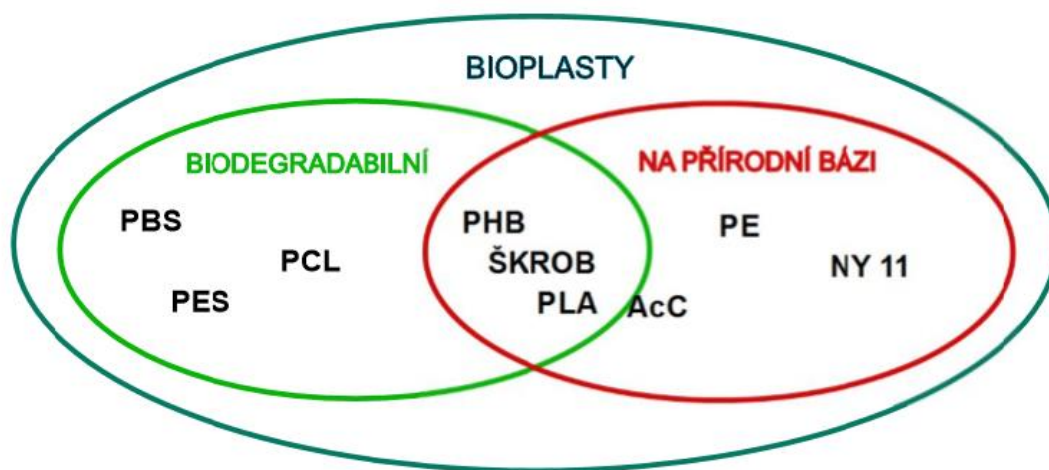
Prvním cílem mojí práce je zmapování standardizovaných metod pro testování biologické rozložitelnosti plastů a vlastní testování biodegradovatelnosti nových typů lehčených polyurethanů v laboratorních podmínkách.

Uvedené metody jsou zaměřeny na kvantifikaci biodegradovatelnosti plastů a nezabývají se osudem nezdegradovaných zbytků. Proto je druhá část práce věnována, na teoretické úrovni, problematice identifikace mikroplastů v životním prostředí. Cílem této části mojí práce je

představení metodik testování koncentrace mikroplastů v marinních ekosystémech, především v sedimentech, s ohledem na možnost jejich využití pro testování množství mikroplastů v půdě. Rešeršní i experimentální části práce jsou koncipovány jako základ pro diplomovou práci, ve které bych ráda prohloubila nasbírané poznatky.

2 Biologicky rozložitelné plasty

V souvislosti s biologickou rozložitelností polymerů se můžeme setkat s několika pojmy, které je potřeba správně odlišovat. Široce rozšířený pojem „bioplast (bio-plastic)“ je často používán nepřesně. „Bioplasty“ můžeme rozdělit do 2 základních skupin: 1) biodegradabilní plasty (biodegradable plastics) syntetizované na fosilní bázi a 2) plasty na přírodní bázi (bio-based plastics) syntetizované z biomasy nebo obnovitelných zdrojů (viz Obr. 1). Je potřeba zmínit, že pouze některé plasty na bázi fosilních surovin mohou být biodegradovány mikroorganismy. Na druhou stranu, ne všechny přírodní plasty jsou biodegradabilní. Acetyl celulóza je příkladem (ne)biodegradovatelného polymeru v závislosti na stupni acetylace. Polymer s vysokým stupněm acetylace je nebiodegradovatelný (Tokiwa et al., 2009).



Obr. 1: Grafické znázornění rozdělení bioplastů – upraveno dle Tokiwa et al. (2009)

PBS – polybutylen sukcinát, PCL – polylakton, PES – polyétersulfon, PHB – polyhydroxybutyrát, PLA – kyselina polymléčná, PE – polyethylen, NY 11 – Nylon 11, AcC – acetyl celulóza

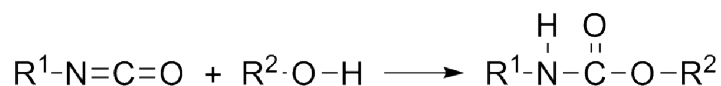
Produkty kyseliny polymléčné (PLA) vznikají z obnovitelných zdrojů. Pro jejich produkci se využívá například kukuřičný škrob (Scott, 2000). Dalším příkladem plasty připraveného na přírodní bázi jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), které jsou syntetizovány některými bakteriemi

ve formě intracelulárních granulí sloužících jako zásoba energie. Této vlastnosti využil brněnský tým pro přípravu poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) za pomoci gramnegativní půdní bakterie *Cupriavidus necator* (Obruča et al., 2010).

Nové typy lehčených polyurethanů, které jsou předmětem mé práce, jsou plasty syntetizované na ropné bázi, které se vlivem peroxidace a následné fragmentace stávají dostupné pro mikroorganismy. Jedná se tedy o tzv. oxobiodegradabilní plasty (viz kapitola 3.2). Bližší informace o složení testovaných materiálů jsou uvedeny v kapitole 4.1.

2.1 Vlastnosti polyurethanů a jejich využití

Polyurethany jsou syntetické polymery složené z jednotek spojených urethanovou vazbou. Kyselina karbamová se přirozeně vyskytuje díky své nestabilitě pouze v podobě svých esterů, zvaných urethany. Jedná se o amid-ester kyseliny uhličitě. Urethany se mohou vyskytovat minimálně ve třech podobách, v závislosti na počtu vodíků navázaných na atom dusíku. Pro přípravu polyurethanů se využívá adiční reakce isokyanátu ($R-N=C=O$) s OH-skupinou jiné sloučeniny ($R-OH$) (Dombrow, 1958):



Obr. 2: Obecná rovnice přípravy PUR (Cottontail, 2007)

Polyurethany jsou složeny z pružných a rigidních částí. Jejich poměr ovlivňuje řadu fyzikálních vlastností daného materiálu (Maafi et al., 2010).

Inkorporací sloučenin s větším množstvím funkčních skupin mohou být polymery v různé míře zesíťovány (tzv. cross-linking), což umožňuje větvení materiálu. Fyzikální vlastnosti polyurethanů, které se mohou vyskytovat v podobě elastomerů i pevných reaktoplastů (termosetů), se tak značně liší (Dombrow, 1958).

Urethanová skupina však reprezentuje jen malou část makromolekuly, v některých případech není přítomna vůbec. Všechny polyurethany ale obsahují polyisokyanáty (Howard, 2011).

Polyurethany mají široké uplatnění, neboť jejich mechanické, termické a chemické vlastnosti mohou být upravovány na základě použitých polyalkoholů a polyisokyanátů (Zia et al., 2007). Použitím polyesterových- či polyetherových-pryskyřic lze připravit polesterový- nebo polyetherový-PUR (Howard, 2011).

Významné je použití polyurethanů pro výrobu lehčených materiálů, které se využívají pro své dobré izolační vlastnosti (např. izolační pěny, polyurethan s obchodním názvem molitan).

Lehčení se dosáhne přidavkem malého množství vody během polymerace. Adicí vody na isokyanát vznikají intermediární karbamové kyseliny, které během dekarboxylace vytvářejí bublinky oxidu uhličitého (McMurry, 2007). Produkce polyurethanových pěn v průmyslovém měřítku spadá do 50. let 20. století (Cregut et al., 2013). V posledních letech roste snaha o přípravu nových polyurethanových pěn s využitím polyolů z recyklovaných polyurethanových pěn a polyolů vyrobených z obnovitelných zdrojů. Dosud byly úspěšně vyrobeny polyurethanové pěny za použití rybího a řepkového oleje pro přípravu polyolů (Beneš et al., 2012, Horák et al., 2015).

Polyurethany jsou také vhodné pro výrobu elastických vláken na plavky a trikoty (McMurry, 2007). Dalším využitím je výroba podrážek v obuvnickém průmyslu. Podrážka z polyurethanu je charakteristická svou trvanlivostí, vysokou resistencí k opotřebování a abrazi, snadnou pigmentací, flexibilitou při nízkých teplotách, výbornou resistencí k olejům a vysokou izolační schopností (Paiva et al., 2015). Dobrých izolačních schopností se nevyužívá jen v obuvnickém průmyslu, široké uplatnění nabízí především stavební průmysl. Brazílský tým testoval v roce 2014 možnost využití polyurethanu jako protihlukové izolace v plovoucích podlahách v obytných domech (Ribeiro et al., 2014).

3 Biodegradace

Složení polyurethanů je velmi heterogenní a jejich složení se liší v závislosti na jejich využití (Cregut et al., 2013). Podle typu polyolu při výrobě mohou být polyurethany rozděleny do dvou podskupin: polyesterové- a polyetherové polyurethany (Urbanski, 1977) V 60. a 70. letech 20. století byla snaha omezit biodegradaci polyurethanů pro zajištění rezistence materiálu. Byly prováděny testy pro posouzení rezistence. Po tříměsíční inkubaci ve skládkovém odpadu nebyly prokázány významné změny v molekulární váze u většiny PUR s výjimkou PUR na polyesterové bázi, kde byl zaznamenán pokles molekulární váhy o 30 % (Filip, 1978).

Rozdílný průběh degradace u různých typů polyurethanů je přisuzována jejich lišícím se vlastnostem (struktura molekuly, krystalinita, cross-linking a funkční skupiny v polymerních řetězcích, které determinují přístupnost degradujícího enzymu k molekule) (Pathirana et al., 1983). Degradace probíhá selektivně. Amorfni části polymerů jsou snáze degradovatelné oproti krystalickým částem (Rafiemanzelat et al., 2015).

Howard (2002) rozděluje biodegradaci polyurethanů na: 1) bakteriální 2) houbovou 3) enzymatickou (pomocí polyurethanáz, které depolymerizují substrát).

Příklad druhů bakterií: *Comamonas acidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus*, *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp. (Howard, 2002, Rafiemanzelat et al., 2015).

Příklad druhů hub: *Curvularia senegalensis*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp. (Howard, 2002).

Byla publikována dostupnost urethanových vazeb mikrobiálnímu ataku. Existuje tedy předpoklad, že hydrolýza urethanových vazeb je mechanismem biodegradace PUR. Dle některých studií (Nakajima-Kambe et al., 1995, Howard et al., 1999) došlo k poklesu poměru mezi polyesterovými a polyetherovými vazbami o 50 %, což se shodovalo s množstvím degradovaného polyurethanu.

(Howard et al., 1999) izoloval a charakterizoval dva typy polyurethanáz. Prvním typem byl enzym vázaný na buněčnou membránu, druhým byl extracelulární enzym. Oba hrají důležitou roli v biodegradaci polyurethanu. První typ umožňuje buněčný přístup k hydrofobnímu povrchu polyurethanu, zatímco extracelulární typ se přilepí na povrch polyurethanu. Díky této interakci se mohou bakterie navázat na substrát a hydrolyzovat jeho vazby.

Hydrolýza esterových vazeb je umožněna také produkcí esteráz bakteriemi. Tento enzym byl identifikován u *Comamonas acidovorans* (Nakajima-Kambe et al., 1997). Esterázová aktivita byla také zaznamenána u *Curvularia senegalensis* (Crabbe et al., 1994).

3.1 Mechanismus biodegradace

Biodegradace polymerů probíhá dvěma odlišnými mechanismy v závislosti na vlastnostech polymeru a prostředí. Prvním mechanismem je abiotická nebo biotická hydrolýza následovaná bioasimilací (tzv. hydro-biodegradace). Druhým mechanismem biodegradace je peroxidace, na kterou navazuje bioasimilace nízkomolekulárních produktů (tzv. oxo-biodegradace). Abiotická peroxidace může být kontrolována použitím antioxidantů. Působením přírodních podmínek (jako je světlo, teplo) může dojít k tvorbě prooxidantů, které katalyzují fragmentaci materiálu (Scott, 1999) .

Polymery s vysokou hodnotou molekulární váhy jsou primárně oxidovány nebo hydrolyzovány enzymy na funkční skupiny, které zlepšují hydrofilní vlastnosti materiálu. Pak je polymer depolymerizován mikrobiálními enzymy a následně absorbován do mikrobiálních buněk a

rozložen. Organický uhlík je mikroorganismy využit jako zdroj energie (Rafiemanzelat et al., 2015). Konečným produktem mineralizace je oxid uhličitý a voda (Tokiwa et al., 2009).

3.2 Vliv aditiv na biodegradaci

Biodegradability polyurethanů je obecně dosahováno inkorporací nestálých a hydrolyzovatelných skupin do polymerního řetězce. Nejčastější metodou pro dosažení této vlastnosti materiálu je použití polyolů, obsahujících hydrolyzovatelné vazby, při výrobě PUR (např. polykaprolakton, polyalkylen adipát, polylaktid, polyglykolid). Zakomponování sacharidových řetězců do polymerů na syntetické bázi umožňuje docílení změny jejich vlastností, např. biodegradace (Varma et al., 2004). Další metoda zahrnuje zavedení hydrolyzovatelné skupiny mezi pevné segmenty. Tato metoda však není tak častá (Rafiemanzelat et al., 2015).

Oxodegradabilní plasty jsou polymery syntetizované na ropné bázi jako konvenční plasty. Narozdíl od nich ale obsahují aditiva, která způsobují, že tyto polymery podléhají oxidační degradaci, jejímž spouštěcím mechanismem je světlo a/nebo teplo (Thomas et al., 2012).

Oxobiodegradabilní plasty obsahují prodegradační aditiva, která umožňují tvorbu nízkomolekulárních produktů oxidace. Tyto produkty jsou posléze zkonsumovány mikroorganismy (Jakubowicz et al., 2012).

Márová et al. (2007) zkoumali vliv použití karboxymethylcelulózy (CMC) v syntéze PUR na biodegradaci různými kmeny bakterií. CMC nahradila při syntéze polyurethanových pěn a elastomerů v koncentracích 1, 5, 10, 20, 30 a 40 % komerční polyether polyol. Pro degradaci byly použity kultury bakterií *Arthrobacter globiformis* a *Comamonas acidovorans*, a také smíšené kultury termofilních bakterií (především *Bacillus* sp. a *Thermus* sp.). Během 4-6 týdnů byly modifikované PUR testovány jako potenciální zdroj uhlíku a dusíku pro růst zmíněných bakterií. Stupeň degradace PUR pěn korespondoval s růstem kultur *A. globiformis* a *C. acidovorans* a s podílem CMC. Nejvyšší míry degradace bylo dosaženo v případě použití 40 % CMC. Ve smíšených kulturách *Thermophilus* sp. byla také degradace závislá na podílu CMC. Růst bakterií se snižoval s nárůstem stupně degradace, což mohlo být způsobeno uvolňováním toxických produktů biodegradace do kultivačního média. Nicméně stupeň degradace byl několikrát vyšší u směsných kultur než při použití samostatných kmenů.

Polyurethan na bázi škrobu vykazuje schopnost degradability. Byla pozorována vyšší míra adheze mikroorganismů *Bacillus subtilis* k polyurethanu na bázi škrobu než k výchozímu materiálu (Savelyev et al., 2014).

Savelyev et al. (2014) testovali biodegradabilitu polyurethanových pěn, při jejichž syntéze byl použit isokyanát na bázi disacharidů, laktózy, maltózy a sacharózy. Nově syntetizované materiály (PUF/DS) měly podobné vlastnosti jako konvenční polyurethanové pěny (PUF) s tím rozdílem, že podléhaly kyselé/alkalické hydrolýze a degradaci při inkubaci v půdě. Konvenční PUF vykazovaly po 12měsíční inkubaci pouze 2-2,5% ztráty hmotnosti. Naopak PUF/DS s 28,6% podílem uhlovodíků dosáhly po stejné době zhruba 40-53% hmotnostní ztráty. Zakomponování přírodních látek do struktury pěn tak evidentně ovlivnilo biodegradaci materiálu.

Biodegradační vlastnosti polyurethanového materiálu je možné podpořit zavedením oleje ze sójových bobů do jeho struktury. Obsah přírodního oleje urychlil proces degradace polyurethan-akrylátu v půdních podmínkách (Oprea, 2015).

3.3 Dostupné metody pro testování biodegradace

Pro srovnání výsledků různých studií jsou potřebné mezinárodní standardy, které stanovují experimentální podmínky. Proto v této kapitole uvádím pouze standardizované metody.

Vzhledem k tomu, že námi testované nové lehčené polyurethany spadají do skupiny oxo-biodegradabilních plastů, je třeba zmínit normu ASTM International:

3.3.1 D 7444-11 – Standard Practice for Heat and Humidity Aging of Oxidatively Degradable Plastics

Tento postup ukazuje, jakým způsobem testovat charakteristiky oxidativní degradace u plastů, které degradují při atmosférickém tlaku a simulacích teploty a vlhkosti. Testovaná látka však není v kontaktu s přirozeným prostředím svého rozkladu (půda, skládka odpadu nebo kompost). Výsledky tohoto testování proto nemohou být extrapolovány na degradaci materiálu v přírodních podmínkách. V přírodních podmínkách je předpokládána přítomnost dalších faktorů ovlivňujících degradaci. Materiály na skládkách jsou například ovlivněny menší přítomností kyslíku než odpovídá atmosférickému složení vzduchu. Jedná se spíše o porovnání laboratorních studií. Na základě tohoto standardu by neměla být vytvářena tvrzení pro reálné podmínky vnějšího prostředí.

Ve standardu je pouze přemýšleno o definování podmínek expozice – atmosférický tlak, různé teploty a kontrolované hodnoty vlhkosti. Rozsahy teplot a vlhkosti jsou vybírány v závislosti na

prostředí, pro které je materiál určen, a na jejich běžných sezónních podmínkách. Např.: půda (15-40 % vlhkosti); skládka (35-60 % vlhkosti); kompost (45-70 % vlhkosti). Je možné provést expozici při nulové vlhkosti a výsledky porovnávat se vzorky exponované požadovaným stupňům vlhkosti.

Pro predikce oxidace plastů v reálných podmínkách doporučuje D 7444-11 použít dalších metodických testů, jako je:

3.3.2 D 5338 (ISO 14855)– Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions

Tato metoda vyžaduje minimálně 90denní test, který hodnotí schopnost materiálu biodegradovat v aerobním prostředí kontrolovaného kompostování při teplotě odpovídající termofilní fázi kompostování v laboratorních podmínkách. Materiál je vystaven působení bakteriálního inokula izolovaného z kompostu komunálního pevného odpadu. Teplota, aerace a vlhkost jsou pečlivě monitorovány. Pro měření je využito respirace v závislosti na čase. Tato metoda je aplikovatelná pro všechny typy plastů, u nichž je předpokládáno kompostování v zařízeních dosahujících termofilních teplot.

Tato norma je uvedena jako jedna z nedílných součástí ISO 17088:2012, jejímž cílem je identifikovat plasty a produkty z nich, které se rozpadnou a uspokojivě se biodegradují v kompostovacích podmínkách a nezanechávají po sobě persistentní nebo toxická rezidua. Tato ISO norma odpovídá normě ASTM D 6400-12.

3.3.3 D 5988 (ISO 17556) - Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting

Tato metoda umožňuje determinovat stupeň aerobní biodegradace syntetických plastových materiálů nebo plastových residuálních materiálů při kontaktu s půdou nebo směsí půdy a kompostu za laboratorních podmínek. Produkce CO₂ vznikajícího při rozkladu organické hmoty mikroorganismy je vyjádřena jako podíl naměřeného nebo vypočítaného obsahu uhlíku v daném vzorku v závislosti na čase. Alternativou je měření spotřeby kyslíku potřebného pro biochemickou přeměnu vzorku (Biochemical oxygen demand - BOD). Je měřeno množství kyslíku potřebného pro udržení konstantního obsahu plynu v respirační nádobě nebo změna v obsahu a tlaku (případně kombinace obojího). Míra biodegradace je vyjádřena v procentech porovnáním BOD s teoretickou spotřebou kyslíku (Theoretical oxygen demand - ThOD). Při

tomto postupu musí být brán v potaz vliv nitrifikace. Tato metoda je určena pro všechny typy plastů, které neinhibují mikroorganismy v půdě.

3.3.4 D 5511 (ISO 15985) – Standard Test Method for Determining Anaerobic Degradation of Plastic Materials Under High-Solids Anaerobic-Digestion Conditions

Tato metoda, hodnotící stupeň biodegradace plastových materiálů v anaerobních podmínkách, pracuje s metanogenním inokulem izolovaným z předupraveného odpadu z domácností podléhajícího anaerobnímu rozkladu. Anaerobní degradace probíhá při vysokém obsahu sušiny (více než 30 % celkové sušiny) za neměnných podmínek. Metoda měří míru (v procentech) přeměny uhlíku ve vzorku na uhlík v plynné formě. Tato metoda může připomínat některé podmínky biologicky aktivních skládek, kde je produkován plyn zachytáván a produkce bioplynu je aktivně podněcována inokulem (např. spoluukládáním kalů odpadních vod a recirkulací výluhu), kontrolou vlhkosti (např. recirkulací výluhu), kontrolou teploty (např. krátkodobým dodáním kyslíku nebo ohříváním cirkulujícího výluhu). Tato metoda je aplikovatelná pro všechny plastové materiály, které neinhibují mikroorganismy přítomné v zařízeních pro anaerobní digesce komunálního odpadu.

4 Experimentální část

Předmětem zkoumání byly různě upravené lehčené polyurethany, které můžeme zařadit mezi oxobiodegradabilní plasty. Materiály připravilo Centrum polymerních materiálů a technologií Otty Wichterle (inovační centrum Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.) pod vedením Ing. Hynka Beneše, Ph. D.. Cílem dr. Beneše je připravit vhodné materiály pro výrobu pěnových materiálů s aplikací v zemědělské krajině, které by bylo možné ponechat po skončení jejich životnosti působení povětrnostních podmínek a biodegradačních procesů v půdním prostředí.

Nové materiály byly porovnávány s konvenčním PUR. Pro porovnání biologické rozložitelnosti polyurethanů v laboratorních podmínkách byla zvolena výše zmíněná standardizovaná metoda **D 5988** (ASTM International, PA, United States), která je ekvivalentem ISO 17556. Tato metoda umožňuje simulaci rozkladu polyurethanů po skončení jejich funkce v půdě působením mikroorganismů v aerobních podmínkách a je tedy vhodná s ohledem na plánované využití nově syntetizovaných polyurethanů v zemědělské krajině.

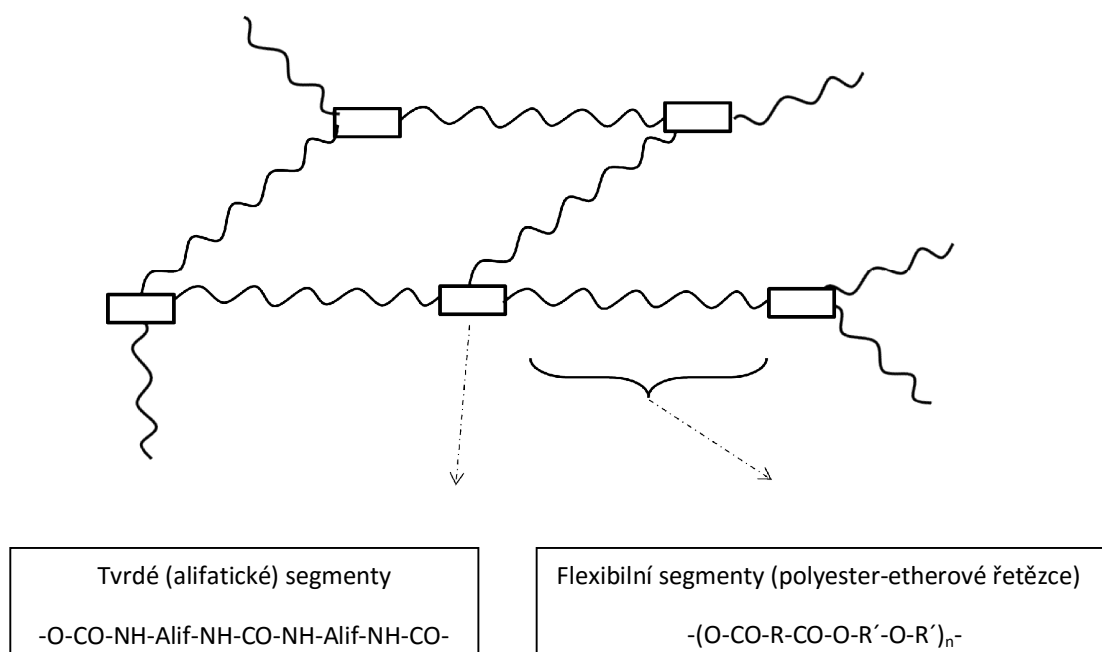
Kvůli podezření na podhodnocení výsledků byl navržen nový experiment, ve kterém byl k hydroxidu draselnému (KOH) před titrací přidáván chlorid barnatý (BaCl_2). Byl testován jeho vliv na interpretaci výsledků dle normy D 5988.

Pro další testování bylo vzhledem k časové a instrumentální náročnosti testu dle normy D 5988 nutné navrhnout zjednodušený experiment pro rychlé otestování biodegradačního potenciálu nových materiálů. Byla navržena metoda měření optické denzity (absorbance při 630 nm) tekutého média obsahujícího inokulum, minerální výživu a nadrcené vzorky polyurethanů. Optická denzita je mírou koncentrace namnožených mikroorganismů v tekutém médiu. Metoda byla doplněna o vizuální hodnocení porůstání povrchu polyurethanů biofilmem pomocí elektronové mikroskopie (obrázky jsou součástí příloh).

4. 1 Charakteristika testovaných materiálů

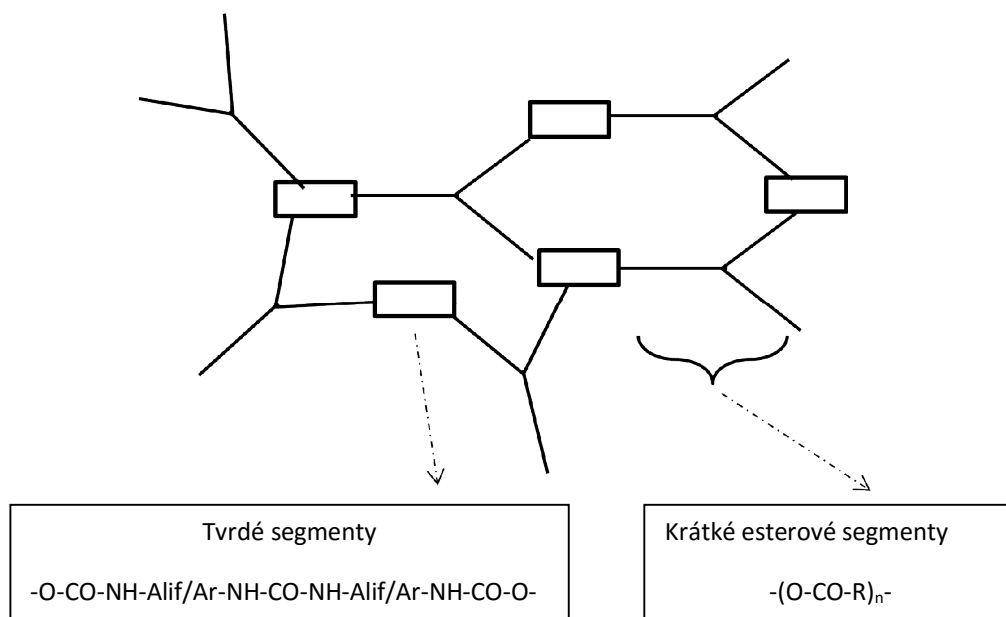
Struktury testovaných materiálů jsou znázorněny schematicky. Přesná složení jsou tvůrcům známa, ale není možné je uveřejňovat.

V testu podle normy D 5988 byly použity materiály označené PUR A-D. Polyurethany PUR-A a PUR-B jsou měkké (flexibilní) pěny se stejnou schematickou strukturou. PUR-B se liší složením, obsahuje 20 % (hm.) maltodextrinu.



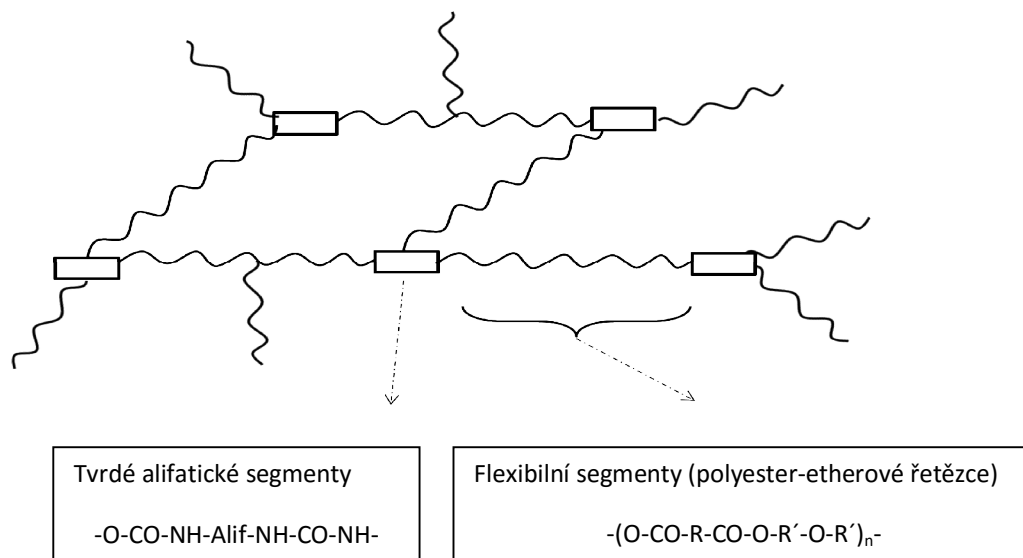
Obr. 3: Schematické znázornění struktury PUR-A, PUR-B

Materiály PUR-C a PUR-D jsou rigidní pěny se stejnou schematickou strukturou. Liší se svými tvrdými segmenty, PUR-C je tvořen alifatickými řetězci, PUR-D obsahuje aromatické segmenty.



Obr. 4: Schematické znázornění struktury PUR-C, PUR-D

Pro testování screeningovou metodou byly použity konvenční polyurethan PUR-K, PUR-B₁ a PUR-B₂ (se stejným složením jako PUR-B v předchozím pokusu, lišící se datem přípravy) a dva nové materiály PUR-1 a PUR-2. Tyto materiály se liší použitým katalyzátorem při jejich syntéze. Pro přípravu PUR-1 byl použit konvenční organocínový katalyzátor (DBTDL), pro PUR-2 byl použit reaktivní aminový katalyzátor.



Obr. 7: Schematické znázornění struktury PUR-1 a PUR-2

4.2 Testování biodegradace nových typů lehčených polyurethanů dle normy D 5988

Principem metody je mineralizace biodegradovatelného materiálu působením půdních mikroorganismů v aerobních podmínkách až na oxid uhličitý (CO₂). Ten je zachytáván v kádinkách s hydroxidem draselným (KOH). Nezreagovaný KOH je titrován kyselinou

chlorovodíkovou (HCl). Mineralizace je vyjádřena jako kumulativní množství uvolněného CO₂ (%) v závislosti na čase, během kterého je materiál vystaven působení půdních mikroorganismů.

4.2.1 Analýza půdních vlastností

Na jaře 2015 byla v okrese Praha-Západ odebrána polní půda. Před začátkem pokusu byla půda přeseta přes síta s průměrem ok 2 mm a byly analyzovány její vlastnosti. Vodní kapacita (WHC- Water-Holding Capacity) byla změřena pomocí metody, kterou popsali Harding and Ross (1964). K 25 g čerstvé půdy, umístěné do nálevky s filtračním papírem a zátkou, bylo přidáno 50 ml vody. Přes noc byla část vody půdou pohlcena, přebytek byl ráno vypuštěn a následně ponechán samovolnému vykapávání po dobu tří hodin. Ze zvlhčené půdy byla v sušárně při 105°C stanovena sušina. Sušina nezvlhčené půdy byla stanovena za stejné teploty. pH půdy bylo stanoveno podle normy ISO 10390. Pro stanovení bylo použito 5 ml na vzduchu sušené půdy a 25 ml deionizované vody. Po 60min třepání a 60min usazování suspenze bylo skleněnou elektrodou změřeno pH. Ztráta žíháním byla změřena po žíhání vysušené půdy v muflovací peci při teplotě 550°C po dobu 5 hodin. Pomocí CHNOS analyzátoru Carlo Erba EA1108 byl změřen obsah celkového organického uhlíku a dusíku.

4.2.2 Analýza nově syntetizovaných materiálů

Pokus probíhal od 22. května do 20. října 2015.

Pro testování byly použity 4 typy nových polyurethanů, označených PUR A-D, konvenční polyurethan označený PUR-K, pozitivní kontrola, Kontrola-CEL, tvořená snadno rozložitelnou celulórou a negativní kontrola, Kontrola-N, tvořená půdou bez přídavku dalšího materiálu. Polyurethany a kontroly byly testovány ve dvou opakováních. Polyurethany a celulóza byly nastříhány na kousky cca 5x5 mm.

Dle metodiky D 5988 byla upravena půdní vlhkost a množství dusíku pomocí roztoku hydrogenfosforečnanu amonného (4,72 g/l). Do uzavíratelných sklenic bylo odváženo 300 g upravené půdy a 300 mg daného vzorku (negativní kontrola obsahovala pouze upravenou půdu). Materiál byl s půdou důkladně promíchán. Na povrch půdy byl položen hliníkový stojánek s čtnými otvory. Na stojánek byly umístěny dvě 100ml kádinky, jedna s 50 ml vody pro udržení vlhkého prostředí uvnitř láhve, druhá s 20 ml KOH (0,5 M). Láhve byly uzavřeny a vloženy do termoboxu bez přístupu světla s vnitřní teplotou 21 ± 2°C.

Uvolněný CO₂ byl zachytáván do KOH. Nezareagovaný KOH byl titrován HCl (0,25 M) na indikátor fenolftalein. Prvních pět titrací proběhlo v intervalech 3-4 dnů. Následně byly vzorky titrovány

1x týdně (s výjimkou posledních dvou titrací, kdy byly intervaly prodlouženy). Během každé titrace byly láhve otevřené, aby došlo k důkladnému prokysličení vnitřního prostředí.

4.2.3 Poznámky k pokusu

Dne 1.7.2015 byla půda ve všech lahvích pohnojena 10 mg dusíku pro oživení aktivity mikroorganismů. Dne 19.8. 2015 došlo nedopatřením k znehodnocení vzorku C2 (nebyl dále zahrnut do výsledků). Dne 26.8.2015 byla půda oživena 10 mg dusíku ve formě hydrogenfosforečnanu amonného a stopovými prvky v koncentraci 1ml na 1 l vody.

4.2.4 Hodnocení významu přidání BaCl_2 před titrací pro fixaci absorbovaného CO_2

Během dvou měsíců byla porovnávána mineralizace celulózy s BaCl_2 a bez jeho použití. Do 500ml uzavíratelných sklenic označených KON 1; KON 2; KON + BaCl_2 1; KON + BaCl_2 2 (kontrola) a CEL 1; CEL 2; CEL + BaCl_2 1; CEL + BaCl_2 2 (celulóza) bylo odváženo 100 g půdy. Do půdy bylo přidáno 16 ml destilované vody pro zajištění optimální vlhkosti a 4 ml roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (4,72 g/l) pro zajištění optimálního poměru C:N dle normy D 5988. Na povrch půdy byly položeny do každé nádoby dvě 25ml kádinky. Jedna obsahovala 20 ml destilované vody pro zajištění vlhkosti, druhá 10 ml 0,5 M KOH pro absorpci CO_2 . Byl připraven zásobní roztok BaCl_2 (125 g/l). Před titrací bylo vždy přidáno 7 ml roztoku do příslušné kádinky s KOH a absorbovaným CO_2 pro jeho fixaci. Množství potřebného BaCl_2 bylo stanoveno experimentálně tak, aby došlo k vytvoření sraženiny v celém objemu KOH s absorbovaným CO_2 . Titrace byla prováděna jednou týdně po dobu dvou měsíců.

4.3 Screeningová metoda pro testování biodegradace nových typů lehčených polyurethanů

Inokulum bylo připraveno z aktivovaného čistírenského kalu a výluhu ze zahradního kompostu v poměru 1:1. Každý vzorek (PUR-K, PUR-B₁ a PUR-B₂, PUR-1 a PUR-2) byl testován ve dvou paralelách.

Dle metodiky, kterou publikovali Obruča et al. (2013), bylo připraveno minerální médium (3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g K_2HPO_4 , 11,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g MgSO_4 v 1 l destilované vody) a roztok obsahující stopové prvky (9,7 g FeCl_3 , 7,8 g CaCl_2 , 0,156 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,119 g CoCl_2 , 0,118 g NiCl_2 , 0,062 g CrCl_2 v 1 l 0,1 M HCl). Do dvanácti označených Erlenmayerových baněk bylo napipetováno 50 ml minerálního média, 0,05 ml stopových prvků (1 ml stopových prvků na 1l minerálního média) a 0,5 ml inokula (1:100 vzhledem k minerálnímu médiu). Do 96jamkové transparentní destičky byly napipetovány vzorky (200 μl do jamky), vždy v osmi opakováních. Ve spektrofotometru Tecan Infinite 200 PRO byla při vlnové délce 630 nm změřena počáteční hodnota absorbance. Poté bylo do Erlenmayerových baněk odváženo přibližně 0,5 g

testovaného materiálu. Dvě baňky obsahovaly pouze minerální médium, stopové prvky a inokulum a sloužily jako kontrola. Baňky byly překryty alobalem a vloženy do termoboxu (30°C). Absorbance byla měřena dvakrát týdně za použití výše zmíněných parametrů. Před opětovným uložením do termoboxu byly baňky promícháním provzdušněny a opět překryty alobalem.

4.4 Výsledky

4.4.1 Vlastnosti půdy

Čerstvá půda obsahovala 90,5 % sušiny, hodnota vodní kapacity byla 34,3 %. Hodnota pH a další půdní charakteristiky půdy před pokusem (původní) a po jeho ukončení jsou spolu se směrodatnou odchylkou uvedeny v Tab. 1. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou až pěti opakování.

Tab. 1: Charakteristiky půdy

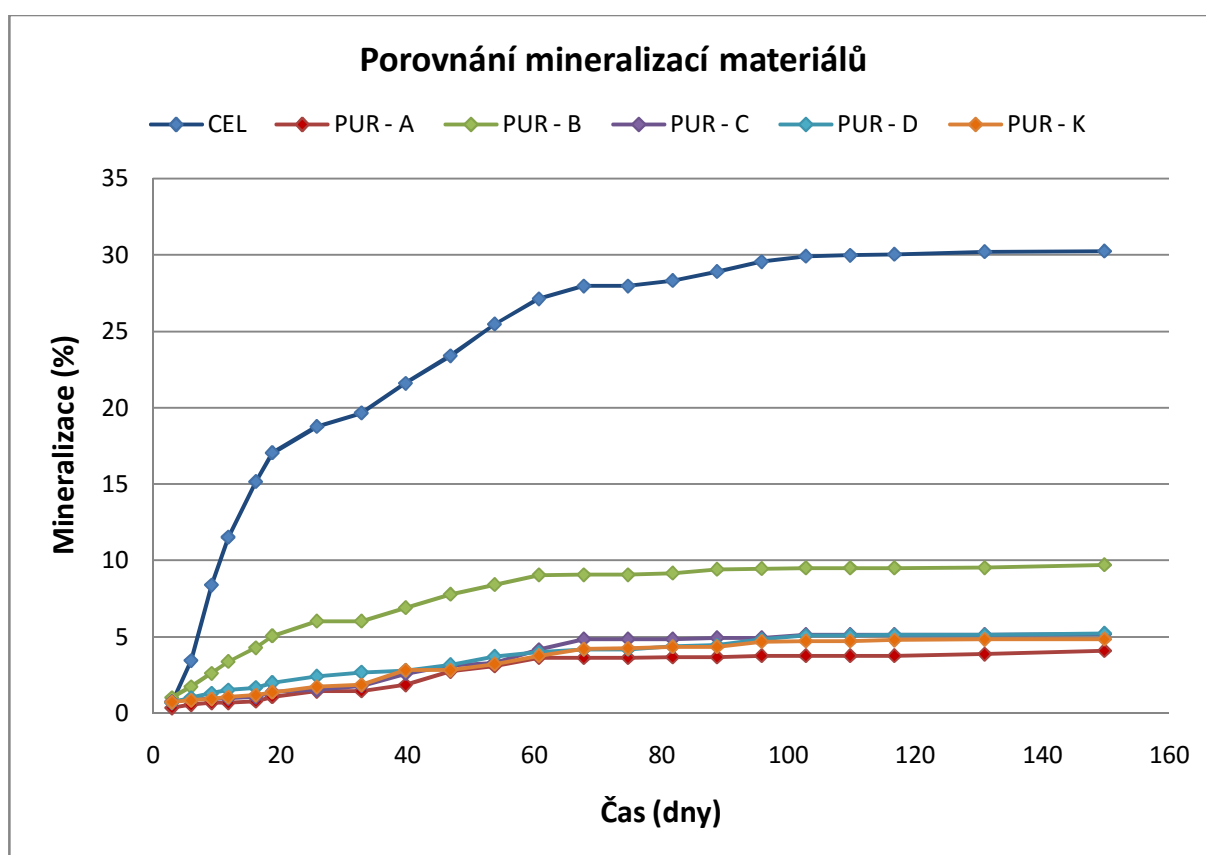
Půda	pH	Ztráta žíháním (%)	C (%)	N (%)	C:N
Původní	6,64±0,14	6,60±0,06	20,08±0,83	1,47±0,24	13,85±1,98
Kontrola	6,18±0,06	6,53±0,03	21,79±0,13	2,03±0,19	10,77±0,91
Celulóza	6,32±0,05	6,52±0,41	22,06±1,02	2,03±0,10	10,88±0,01
PUR-A	6,21±0,04	6,55±0,15	21,58±0,34	1,97±0,09	10,98±0,66
PUR-B	6,26±0,00	6,77±0,11	20,93±0,24	2,04±0,31	10,38±1,72
PUR-C	6,28±NA	6,49±0,12	21,46±0,95	2,16±0,09	9,92±0,04
PUR-D	6,25±0,05	6,72±0,15	21,11±0,23	1,92±0,03	11,02±0,29
PUR-K	6,22±0,03	6,61±0,02	20,90±0,98	1,98±0,03	10,57±0,35

4.4.2 Pokus dle normy D 5988

Porovnání mineralizace jednotlivých vzorků v závislosti na čase je uvedeno v Tab. 2 a na Obr. 1. Během 150 dní byl nejlépe rozložen PUR-B, jehož mineralizace dosahovala téměř 10 %. Mineralizace ostatních polyurethanů, včetně konvenčního, se pohybovala mezi 4 a 5 %. Pozitivní kontrola (celulóza) byla dle metodiky zmineralizována z 30,25 %, i přes to, že na konci pokusu nebyly v půdě nalezeny žádné viditelné kousky celulózy. Naopak testované materiály byly po vyjmutí z půdy kompaktní.

Tab 2 : Stupeň mineralizace materiálů (%)

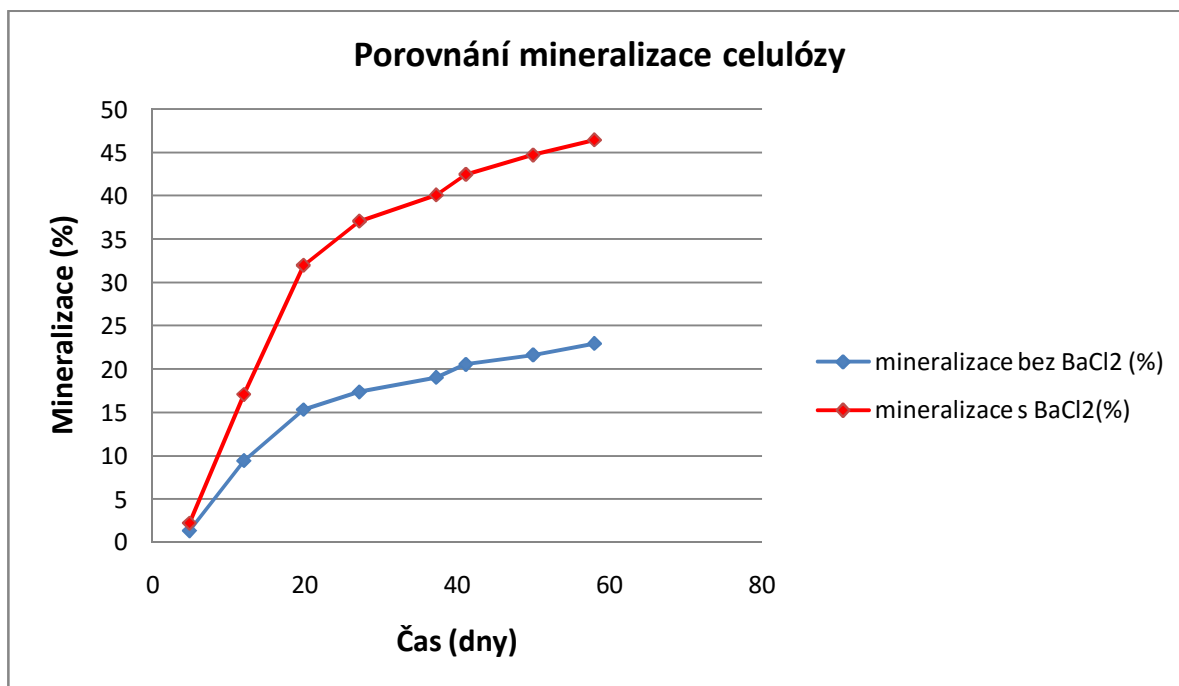
Materiál	Mineralizace (%)	Směrodatná odchylka
PUR-A	4,11	0,12
PUR-B	9,73	1,95
PUR-C	4,68	0,56
PUR-D	5,25	0,37
PUR-K	4,85	0,06
CEL	30,25	2,28



Obr. 5: Porovnání stupně mineralizace vzorků (nově syntetizované polyurethany PUR - A, B, C, D; konvenční polyurethan PUR-K; celulóza CEL (pozitivní kontrola)

4.4.3 Modifikace normy D5988 aplikací BaCl_2

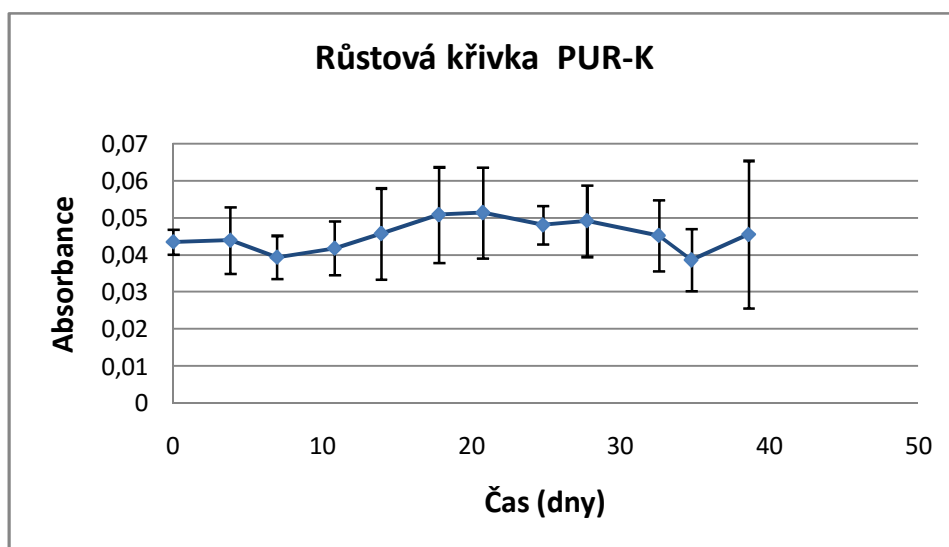
Mineralizace celulózy bez použití BaCl_2 (dle metodiky D 5988) dosahovala po 60 dnech pokusu pouze 22,95 %, přičemž mineralizace s použitím BaCl_2 měla hodnotu 46,45 %.



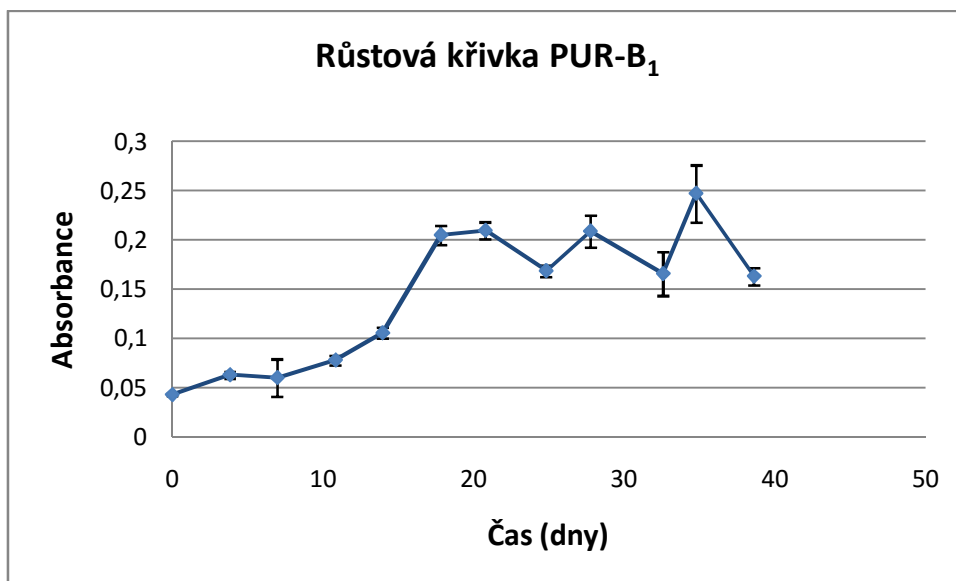
Obr. 6: Porovnání mineralizace bez použití BaCl₂ (dle metodiky D 5988) a s jeho použitím

4.4.4 Screeningová metoda

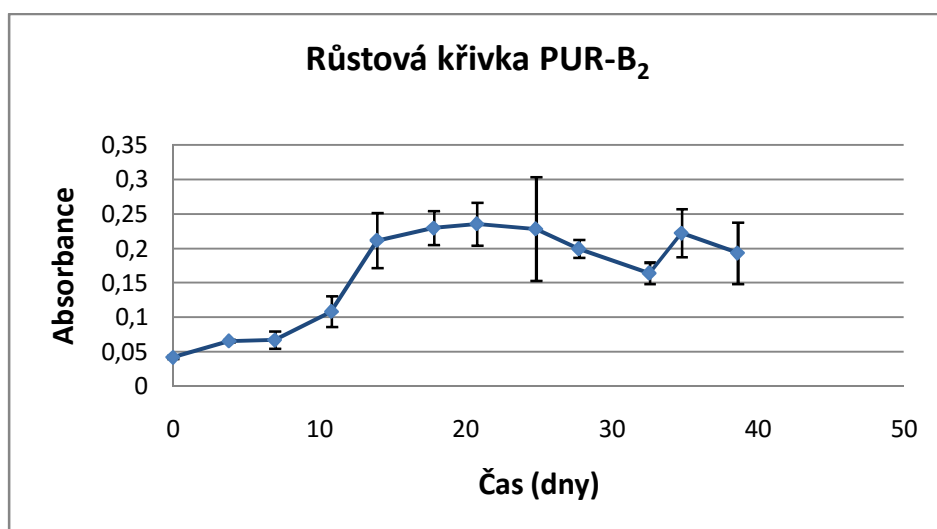
K nejvyššímu namnožení mikroorganismů došlo u PUR-B₁ a PUR-B₂, u nichž byla naměřena absorbance přesahující hodnotu 0,2. U nových materiálů (PUR-1 a PUR-2) došlo k většímu namnožení mikroorganismů u vzorku, pro jehož syntézu byl použit reaktivní aminový katalyzátor. Hodnoty absorbance jsou spolu se směrodatnou odchylkou uvedeny v grafech (Obr. 8-12).



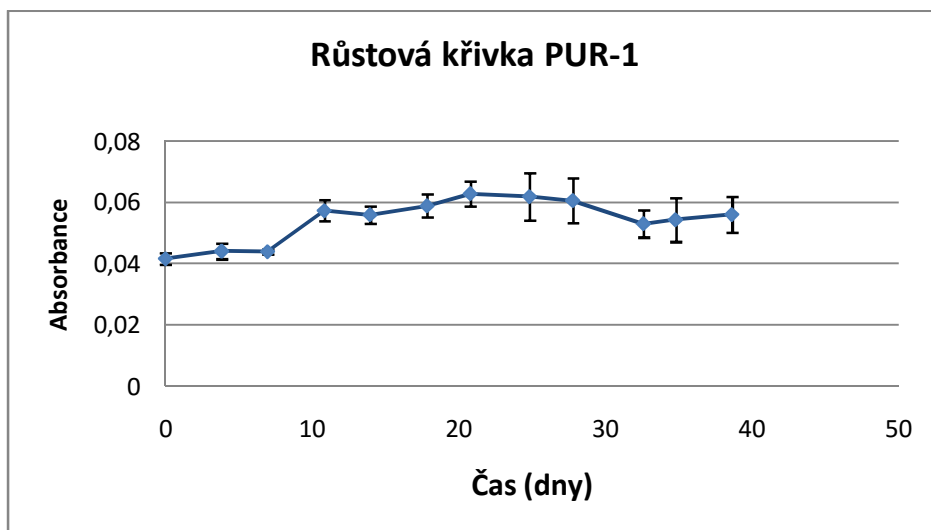
Obr. 8: Růstová křivka PUR-K (absorbance při 630 nm)



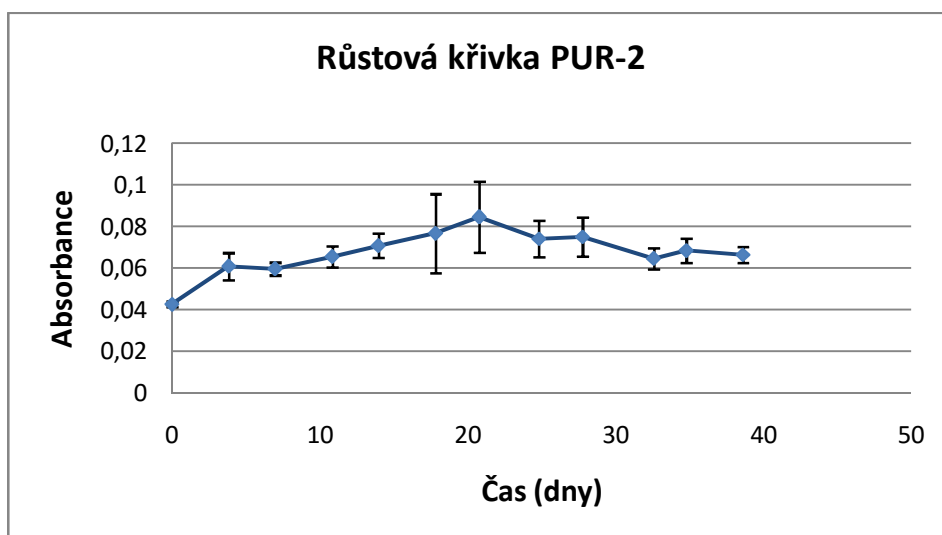
Obr. 9: Růstová křivka PUR-B₁ (absorbance při 630 nm)



Obr. 10: Růstová křivka PUR-B₂ (absorbance při 630 nm)



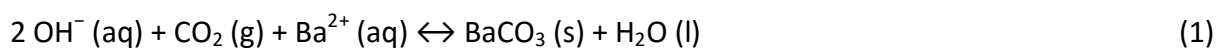
Obr. 11: Růstová křivka PUR-1 (absorbance při 630 nm)



Obr. 12: Růstová křivka PUR-2 (absorbance při 630 nm)

4.5 Diskuze

Dle použité normy D 5988 by měla mineralizace pozitivní kontroly (celulózy) dosáhnout alespoň 70%. Hodnota mineralizace dosahovala dle normy pouhých 30,25 %. V půdě však po skončení pokusu nebyly viditelné žádné nerozložené zbytky. Zjevně tedy docházelo k podhodnocení výsledků. Proto byl navržen nový experiment, ve kterém byl ke KOH před titrací přidáván chlorid barnatý (BaCl_2). Chlorid barnatý reaguje s CO_2 za vzniku uhličitanu barnatého (BaCO_3), který je nerozpustný ve vodě dle rovnice (1) (Crittter, et al., 2011). Dochází tak k fixaci absorbovaného CO_2 .



ve screeningové metodě byl u materiálů PUR-1 a PUR-2, které se lišily použitými katalyzátory, zaznamenán rozdíl v namnožení mikroorganismů. PUR-1 byl syntetizován pomocí organocínového katalyzátoru (DBTDL). Vyšší hodnoty absorbance byly naměřeny u PUR-2, pro jehož syntézu byl namísto organocínového katalyzátoru použit reaktivní aminový katalyzátor.

4.6 Závěr

Postupem dle metodiky D 5988 došlo k podhodnocení výsledků mineralizace testovaných materiálů. Výsledky srovnávacího testu potvrzují, že použití BaCl_2 je žádoucí pro zabránění úniku CO_2 během titrace a správnou interpretaci výsledků, přestože standardizovaná norma přidavek BaCl_2 neuvádí (zřejmě kvůli jeho toxicitě).

Testované materiály byly po pětíměsíčním působení půdních mikroorganismů stále kompaktní a nejevily příliš velké známky fragmentace (viz Příloha 5).

Vysoká míra biodegradovatelnosti materiálu PUR-B, zjištěná v pokusu dle D 5988, byla potvrzena také navrženou screeningovou metodou. Druh katalyzátoru použitého pro syntézu nových materiálů může hrát určitou roli v biodegradovatelnosti materiálu.

5 Mikroplasty

Se stále narůstající produkcí plastů se od začátku 21.stol. objevují studie týkající se znečištění marinních ekosystémů tzv. „mikroplasty“. Mikroplasty nejsou přesně definovány, jedná se však o drobné fragmenty či vlákna polymerů, které se s lidskou činností dostávají do oceánů. Velikost, která by je mohla blíže definovat, se pohybuje od $< 1 \text{ mm}$ do $< 10 \text{ mm}$ (Cole et al., 2011). Tyto částice mohou být zkonzumovány vodními organismy (Thompson et al., 2004). Jsou známy studie zabývající se adsorpcí organických polutantů na povrchu mikroplastů. Studie amerického týmu prokázala pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií přítomnost až 988 ng/g polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) v analyzovaných fragmentech plastů sesbíraných na pobřeží (Seal Beach). Dále byla u těchto plastů potvrzena přítomnost ftalátů a dalších látek (například chlordanů). Při analýze nezpracovaných PE-peletek z výroby plastových tašek byla detekována pouze přítomnost ftalátů, zřejmě používaných během výroby (Moore et al., 2005). Testováním PP-peletek ze čtyř lokalit na japonském pobřeží byla detekována přítomnost polychlorovaných bifenyly (PCB), dichlordifenyldichlorethylenu (DDE) a nonylfenolů (NP) v koncentracích $4\text{--}117 \text{ ng/g}$ (PCB), $0,16\text{--}3,1 \text{ ng/g}$ (DDE) a $0,13\text{--}16 \text{ }\mu\text{g/g}$ (NP) (Mato, 2001).

Výskyt mikroplastů, jejich vlastnosti a kvantifikování jsou předmětem mnoha studií. Nejednotnost metod však neumožňuje porovnávání výsledků (Rocha-Santos et al., 2015). Zatím nebyly publikovány studie týkající se koncentrace mikroplastů v půdách a v ovzduší a jejich vlivů na organismy spjatými s těmito složkami prostředí (Rocha-Santos et al., 2015).

5.1 Mikroplasty ve vztahu k půdě

Mikroplasty se mohou v životním prostředí vyskytovat v primární nebo sekundární podobě. Primární mikroplasty můžeme nalézt například v kosmetických přípravcích. Sekundární mikroplasty vznikají rozpadem větších částí plastů jak ve vodních, tak v terestrických ekosystémech (Cole et al., 2011). V zemědělských oblastech mohou být zdrojem pro vznik mikroplastů zbytky po mulčování, případně náhodně se vyskytující plasty. Sekundární mikroplastová vlákna mohou vznikat i praním syntetických textilií. Jeden oděv může dle experimentů vyprodukovat během jednoho praní > 1900 vláken (Browne et al., 2011). Mikroplasty mohou být šířeny také větrem (například ze skládek odpadů). Díky atmosférické depozici se tak mohou stát součástí terestrických ekosystémů (Rillig, 2012). Je důležité zjistit, jestli se mohou mikroplasty akumulovat v potravních sítích a případně uvolňovat změkčovadla či sorbované kontaminanty (Browne et al., 2011). Zdá se, že v oceánech je přestup mikroplastů do potravních sítí snazší díky filtrátorům. V půdě ale také nalezneme řadu filtrátorů, kteří žijí v tenké blance vody na povrchu půdy, například nálevníci a vířníci (*Ciliophora*, *Rotifera*) (Rillig, 2012).

5.2 Kvantifikace mikroplastů v životním prostředí

Vývoj metod pro testování mikroplastů se zatím soustředil na marinní ekosystémy.

Rozlehlost oceánů a sezónně se měnící podmínky výrazně ztěžují kvantifikování mikroplastů. Nicméně bylo vyvinuto několik technik umožňujících zjištění jejich přítomnosti: 1) průzkum pobřeží 2) vzorkování sedimentů 3) použití vlečných sítí 4) pozorovací průzkumy 5) biologické vzorkování (Cole et al., 2011).

Pro půdní analýzy připadají, podle mého názoru, v úvahu průzkumy břehů vodních toků analogických s mořskými plážemi, kde dochází k akumulaci vyplaveného materiálu. Opakováním průzkumů je možné sledovat akumulaci sledovaného materiálu v čase (Ryan et al., 2009). Tento postup je však vhodný spíše pro makroplasty (Cole et al., 2011), které mohou být zdrojem sekundárních mikroplastů při svém rozkladu. Biologické vzorkování zahrnuje analýzu mikroplastů zkonsumovaných organismy. Testováním mikroplastů v trávicím traktu mořských

živočichů se zabývali například (Thompson et al., 2004) nebo (Franecker van et al., 2011). V půdě mohou být mikroplasty zkonsumovány mikro- a mesofaunou, například roztoči (*Acari*), chvostoskoky (*Collembola*) nebo roupicemi (*Enchytraeidae*), čímž může docházet k akumulaci v detritové potravní síti (Rillig, 2012).

Za nejvhodnější metodu pro půdní analýzu mikroplastů považují použití postupů pro vzorkování mořských sedimentů.

Thompson et al. (2004) provedli vzorkování pobřeží a sedimentů u britského pobřeží. K odběru vzorků byly použity malá zednická lžíce a Ekmanův drapák. Plasty a další nízkomolekulární látky byly separovány pomocí roztoku chloridu sodného (NaCl) o hustotě $1,2 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$. 250 ml sedimentu bylo přidáno do solného roztoku, mícháno 30 sekund a po 2 minutách byl supernatant přefiltrován (Whatman GF/A; $1,6 \mu\text{m}$). Filtry byly vysušeny při 20°C , umístěny do Petriho misek, aby se předešlo kontaminaci, a podrobeny zkoumání pod mikroskopem ($\times 30$). Polymery, které bylo možné odlišit od struktury sedimentů, byly identifikovány pomocí IR-spektrofotometrie porovnáním výsledků se spektry běžných polymerů. Bylo identifikováno devět polymerů: akryl, alkyd, poly(ethylen:propylen), polyamid (nylon), polyester, polyethylen, polymethylakrylát, polypropylen, polyvinyl-alkohol. Bylo možné identifikovat fragmenty, které se lišily ve svém vzhledu od zrn sedimentu či planktonu. Některé částice byly tvořeny granulemi, ale většinou se jednalo o výrazně zbarvená vlákna, $\sim 20 \mu\text{m}$ v průměru.

Claessens et al. (2011) navázali na výše zmíněnou metodiku a provedli vzorkování sedimentů u belgického pobřeží pouze s drobnými odchylkami v postupu. Pro analýzu vzorku bylo použito větší množství sedimentu (1 kg nevysušeného sedimentu). Po 2minutovém míchání sedimentu v solném roztoku vzorek 1 hodinu sedimentoval. Poté byl přefiltrován přes $0,38 \mu\text{m}$ síto. Přefiltrované částice byly identifikovány pomocí binokulárního mikroskopu. Byla testována výtěžnost separace mikroplastů ze sedimentu. Výtěžnost závisela na typu polymeru a zrnitosti substrátu, hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3. Identifikace materiálů byla provedena pomocí IR-spektrofotometrie. Výsledky byly pro možnost porovnání s dalšími studiemi prezentovány jak v počtu částic $\cdot \text{kg}^{-1}$ vysušeného sedimentu, tak v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ vysušeného sedimentu.

Nor et al. (2014) dále mírně modifikovali předchozí popsané metody. Před promícháním a filtrací solného roztoku s analyzovaným sedimentem použil pro vzorky sedimentů obsahující částice $< 63 \mu\text{m}$ Tween – 80 (v poměru 1:100 pro mokrý sediment), neionizovaný detergent jako prevenci proti agregaci půdních částic během promíchávání. Pro identifikaci mikroplastů byl použit mikroskop se zvětšením $\times 10$. Pro standardizaci selekce mikroplastů byla použita

následující kritéria: 1) nejsou viditelné buněčné nebo organické struktury 2) vlákna jsou po celé délce stejně silná, nezúžená na koncích 3) homogenní zbarvení 4) vlákna nejsou segmentovaná, nevypadají jako stočené ploché stuhly 5) částice nejsou lesklé. Účinnost extrakce je uvedena v Tab. 3.

Claessens, et al. (2013) přišli s novou metodou detekce mikroplastů v sedimentech. Metoda funguje na principu vyplavení mikroplastů proudem vody ($300 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ po dobu 15 minut) podpořeném aerací. Proud vody byl volen tak, aby písková zrna zůstala usazena na dně válce a lehčí materiál byl proudem unášen. Válec byl pro tuto metodu speciálně sestaven. 500 ml sedimentu bylo přes 1mm síto vpraveno do 147cm válce o vnitřním průměru 15 cm. Principem je fluidizace materiálu pomocí proudu vody procházejícího od dna válce. Lehké mikroplasty jsou proudem vody odnášeny bokem válce otvorem v jeho horní části a jsou zachytávány na $35\mu\text{m}$ sítu. Materiál zachycený na sítu je dále extrahován roztokem jodidu sodného (NaI) o hustotě $1,6 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Po dvoustupňové centrifugaci je vrchní vrstva obsahující mikroplasty přefiltrována přes $5\mu\text{m}$ membránu (Whatman AE98). Extrakce solným roztokem je opakována dvakrát až třikrát. Účinnost metody byla porovnána s postupem navrženým Thompson et al. (2004), viz Tab. 4.

Tab. 3: Rozdílnost účinností extrakce mikroplastů

Studie (autor, rok)	Účinnost extrakce (%)
Claessens et al., 2011	68,8 – 97,5
Nor et al., 2014	54,9 – 71,8
Nuelle et al., 2014	91 – 99*

*s výjimkou EPS (68 %)

Tab. 4: Porovnání účinností nové metody extrakce dle Claessens et al. (2013) s postupem dle metodiky Thompson et al. (2004)

Materiál	Účinnost první extrakce (%)	
	NaCl ($1,2 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$)	Vyplavení + NaI ($1,6 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
Vlákna	75	98
Granule	61	100
PVC částice	0	100

Upraveno dle Claessens et al. (2013)

Nuelle et al. (2014) publikovali novou metodu založenou na fluidizaci a flotaci. Před samotnou analýzou se věnovali testování způsobů upravení sedimentu s cílem odstranit podstatnou část organického materiálu, který bývá zpravidla lehký, vyplouvá na povrch solného roztoku spolu s mikroplasty a ulpívá na filtrech. Autoři navázali na návrh, který publikovali Liebezeit et al. (2012), v němž byl použit pro odstranění organického materiálu 30% peroxid vodíku (H_2O_2). Testovali 30% H_2O_2 , 35% H_2O_2 , 20% HCl a NaOH v koncentracích 20, 30, 40 a 50 % pro odstranění biologického materiálu ve dvou velikostních kategoriích ($> 1 \text{ mm}$ a $< 1 \text{ mm}$). Biologický materiál byl vystaven působení H_2O_2 , NaOH a HCl po dobu sedmi dnů.

Při použití 30% H_2O_2 se zhruba polovina částic zcela rozpustila, druhá polovina také vykazovala známky reakce, rozpustila se částečně nebo se odbarvila či zprůsvitněla. U všech testovaných polymerů (PVC, PET, PA 6, ABS, PC, PUR, PP, LDPE, LLDPE, HDPE) došlo k reakci s H_2O_2 indikované vývojem plynu v různém rozsahu nebo ztenčením či zprůsvitněním materiálu.

Reakce NaOH a HCl s organickým materiálem byly slabší než při použití 30% H_2O_2 . U žádné částice nedošlo k úplnému rozpuštění.

Působením 35% H_2O_2 došlo ke kompletnímu rozpuštění 92 % biologického materiálu z kategorie větších částic, mikročástice ($< 1 \text{ mm}$) se kompletně rozpustily ve 25 % případů. Žádné částice polymerů nevykazovaly signifikantní rozdíl ve velikosti, s výjimkou PP a PE (velikost $< 1 \text{ mm}$), u kterých došlo k redukci o 17,2 a 15,9 %. Autoři však uvádějí, že měření obsahují jistou nepřesnost.

Byla testována účinnost extrakce s použitím kroku oxidace a bez něho. Dle Studentova t-testu nebyl pozorován signifikantní rozdíl v účinnosti. Průměrná účinnost extrakce je uvedena výše v Tab. 3.

Oxidační krok je proto doporučován pouze v případech velkého množství organického materiálu, který ulpívá na filtrech a znemožňuje vizuální selekci mikroplastů.

Samotná extrakce mikroplastů ze sedimentů sestávala ze dvou kroků: fluidizace v roztoku soli s nízkou hustotou a flotace v roztoku o vysoké hustotě.

Pro fluidizaci byl použit roztok NaCl ($1,2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Do skleněné nádoby byla umístěna 2l kádinka, do které bylo napumpováno 1,5 l solného roztoku. Poté byl do roztoku zaveden proud vzduchu (cca $0,1 \text{ l}\cdot\text{s}^{-1}$). Po přidání sedimentu do provzdušňovaného roztoku byly do kádinky napumpovány 4 l roztoku NaCl ($2,4 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$), čímž se v horních vrstvách vyplavovaly lehké mikroplasty, které spolu se solným roztokem přetékalý do vnější skleněné nádoby. Po

spotřebování připraveného roztoku NaCl byla zvýšena rychlost proudu vzduchu na $0,2 \text{ l}\cdot\text{s}^{-1}$. Kádinka byla následně důkladně omyta roztokem NaCl, aby nedošlo ke ztrátám mikroplastů jejich ulpěním na stěnách. Obsah sběrné nádoby byl přefiltrován přes $25\mu\text{m}$ síto z nerezové oceli. Mikroplasty ze síta byly spolu se zbytky sedimentů spláchnuty destilovanou vodou do nádoby, odkud byly pomocí 800 ml roztoku NaCl dekantovány na filtrační papír, který byl při 60°C vysušen.

K flotaci byl použit roztok NaI ($1,8 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Vzorek sedimentu byl umístěn do odměrné baňky, roztok NaI byl doplněn zhruba do $\frac{3}{4}$ baňky. Obsah baňky byl ručně protřepán a poté doplněn roztokem NaI na kalibrovaný objem. Obsah byl znovu protřepán a doplněn roztokem NaI 1 cm pod okraj baňky. Po 10min sedimentaci byl supernatant dekantován do kádinky tak, aby hladina roztoku NaI dosahovala zhruba 1 cm pod okraj zúžení baňky. Sediment byl znovu promíchán. Proces třepání - doplnění roztokem NaI - dekantace byl opakován pětkrát. Supernatant byl vakuově přefiltrován přes $0,45\mu\text{m}$ filtr z nitrocelulózy. Kádinka byla propláchnuta asi 250 ml destilované vody, roztok NaI byl uschován pro opětovné použití. Filtr byl vzduchem vysušen pro další analýzu.

Filtry byly podrobeny optické analýze za použití stereomikroskopu se zvětšením $\times 6,5\text{--}40$. Částice, které byly identifikovány jako potenciální mikroplasty, byly separovány pinzetou. Separované částice byly analyzovány použitím pyrolýzy pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Výhodou metody je snížení množství mikroplastů v prvním kroku extrakce, čímž se snižuje potřebný objem vysokohustotního roztoku NaI, který výrazně zvyšuje náklady. Další výhodou je dostupnost laboratorního vybavení použitého v této metodě na rozdíl od velmi účinné metody publikované Claessens et al. (2013), která však vyžaduje speciální sestavení válce pro aeraci roztoku se sedimentem (Nuelle et al., 2014).

6 Závěry

Konvenční polyurethan téměř nepodléhá biologické rozložitelnosti (biodegradovatelnosti). Vhodným výběrem aditiv a úpravou syntetizovaného materiálu je možné dle literatury i vlastních experimentů docílit částečné biodegradovatelnosti.

Pro zajištění porovnatelnosti výsledků s jinými studiemi je nezbytné používání standardizovaných metod. Použitím metodiky D 5988 však došlo k evidentnímu podhodnocení výsledků. Pro dosažení správnosti výsledků zmíněné respirační metody se osvědčila aplikace BaCl_2 do vzorku s absorbovaným CO_2 v roztoku KOH před jeho titrací. Tento krok zajišťuje fixaci CO_2 v podobě BaCO_3 a zamezuje jeho unikání. Metoda D 5988 je při zavedení aplikace BaCl_2 vhodnou metodou pro testování biologické rozložitelnosti nových typů lehčených polyurethanů.

Měření absorpance v mikrodestičce se vzorky odebranými z tekutého média s nadrceným polyurethanem je vhodnou metodou pro rychlé zhodnocení rozdílů v biodegradovatelnosti jednotlivých materiálů.

Nedokonale rozložené oxobiodegradabilní plasty se jeví jako potenciální zdroj sekundárních mikroplastů v zemědělské půdě. Kvůli absenci metod pro kvantifikaci mikroplastů v půdě bych se chtěla ve své diplomové práci zabývat aplikací metod pro testování mořských sedimentů na půdní vzorky. Za vhodnou metodu považuji dvoustupňovou extrakci využívající fluidizaci a flotaci, kterou publikovali Nuelle et al. (2014). Metoda dosahuje vysoké účinnosti extrakce a podle mého názoru je realizovatelná v laboratorních podmínkách Ústavu pro životní prostředí. Pro předpokládaný vysoký obsah organického materiálu, který ulpívá na filtrech, bude pravděpodobně nutná jeho separace. Otázkou zůstává, zda bude vhodné použít pro oxidaci organického materiálu peroxid vodíku tak, aby nedošlo k degradaci testovaného polymeru.

Literatura

- BENEŠ, H. et al. Polyurethanes with bio-based and recycled components. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012, **114**(1), 71-83.
- BROWNE, M. A. et al. Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology*. 2011, **45**(21), 9175-9179.
- CLAESSENS, M. et al. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, **62**(10), 2199-2204.
- CLAESSENS, M. et al. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 2013, **70**(1-2), 227-233.
- COLE, M. et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, **62**(12), 2588-2597.
- COTTONTAIL, P. Generalized polyurethane reaction. In: *Wikimedia Commons* [online]. San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, 2007 [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Generalizedpolyurethanereaction.png>
- CRABBE, J. R. et al. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1994, **33**(2), 103-113.
- CREGUT, M. et al. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnology Advances*. 2013, **31**(8), 1634-1647.
- CRITTER, S. A. M., S. S. FREITAS a C. AIROLDI. Calorimetry versus respirometry for the monitoring of microbial activity in a tropical soil. *Applied Soil Ecology*. 2011, **18**(3), 217-227.
- DOMBROW, B. A. *Polyurethanes*. 2. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1958.
- FILIP, Z. Decomposition of Polyurethane in a Garbage Landfill Leakage Water and by Soil-Microorganisms. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1978, **5**(3), 225-231.
- FRANEKER VAN, J. A. et al. Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. *Environmental Pollution*. 2011, **159**(10), 2609-2615.
- HARDING, D. E. a D. J. ROSS. Some factors in low-temperature storage influencing the mineralisable-nitrogen of soils. *Science of Food and Agriculture*. 1964, **15**(12), 829-834.
- HORÁK, P. a H. BENEŠ. Polyurethane foams based entirely on recycled polyols derived from natural oils. *Polimery*. 2015, **60**(9), 579-585.

- HOWARD, G. T. Biodegradation of polyurethane: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2002, **49**(4), 245-252.
- HOWARD, G. T., C. RUIZ a N. P. HILLIARD. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1999, **43**(1-2), 7-12.
- JAKUBOWICZ, I. a J. ENEBRO. Effects of reprocessing of oxobiodegradable and non-degradable polyethylene on the durability of recycled materials. *Polymer Degradation and Stability*. 2012, **97**(3), 316-321.
- LIEBEZEIT, G. a F. DUBAISH. Microplastics in Beaches of the East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012, **89**(1), 213-217.
- MAAFI, M. E., F. MALEK a L. TIGHZERT. Synthesis and characterization of new polyurethane based on polycaprolactone. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, **115**(6), 3651-3658.
- MÁROVÁ, I. et al. Biodegradation of polyurethane foams modified by carboxymethyl cellulose by several bacteria. *Journal of Biotechnology*. 2007, **131**(2), 170-171.
- MATO, Y. et al. Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environmental Science & Technology*. 2001, **35**(2), 318-324.
- MCMURRY, J. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně - Nakladatelství VUTUM, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
- MOORE, Ch. J., G. L. LATTIN a A. F. ZELLERS. A Brief Analysis of Organic Pollutants Sorbed to Pre and Post-Production Plastic Particles from the Los Angeles and San Gabriel River Watersheds. In: *Proceedings of the Plastic Debris Rivers to Sea Conference, Algalita Marine Research Foundation, Long Beach, CA*. 2005.
- NAKAJIMA-KAMBE, T. et al. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, **129**(1), 39-42.
- NAKAJIMA-KAMBE, T. et al. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1997, **83**(5), 456-460.
- NAKAJIMA-KAMBE, T. et al. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, **51**(2), 134-140.
- NOR, N. H. M. a J. P. OBBARD. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*. 2014, **79**(1-2), 278-283.

NUELLE, M.-T. et al. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*. 2014, **184**, 161-169.

OBRUČA, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using. *Biotechnology Letters*. 2010, **32**(12), 1925-1932.

OBRUČA, S. et al. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013, **29**(12), 2417-2428.

OPREA, S. Effects of Introducing Crude and Modified Soybean Oil into Polyurethane Structures on the Soil-Burial Biodegradation Process. *Polymer- Plastics Technology and Engineering*. 2015, **54**(4), 342-349.

PAIVA, R. M. M. et al. Effect of the surface treatment in polyurethane and natural leather for the footwear industry. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. 2015, **46**(1), 47-58.

PATHIRANA, R. A., K. J. SEAL. *Gliocladium roseum* (Bainier), a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. In: *Biodeterioration 5: papers presented at the 5th International Biodeterioration Symposium, Aberdeen, September, 1981/edited by TA Oxley and S. Barry*. Chichester [Sussex]: Wiley, c1983., 1983.

RAFIEMANZELAT, F., M. JAFARI a G. EMTIAZI. Study of Biological Degradation of New Poly(Ether-Urethane-Urea)s Containing Cyclopeptide Moiety and PEG by *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, **177**(4), 842-860.

RIBEIRO, W. B. et al. Characterization of Polyurethan Skin Agglomerates for Acoustic Insulation from Impact Noise. *Material Research-Ibero-American Journal of Materials*. 2014, **17**, 210-215.

RILLIG, M. C. Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil? *Environmental Science & Technology*. 2012, **46**(12), 6453-6454.

ROCHA-SANTOS, T. a A. C. DUARTE. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **65**, 47-53.

RYAN, P. G. et al. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2009, **364**(1526).

SAVELYEV, Y. et al. Degradable polyurethane foams based on disaccharides. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, **132**(25).

SCOTT, G. *Polymers and the Environment*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN 0-85404-578-3.

- SCOTT, G. 'Green' polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 2000, **68**(1), 1-7.
- TEUTEN, E. L. et al Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2009, **364**(1526).
- THOMAS, N. L. et al. Oxo-degradable plastics:degradation, environmental impact and recycling. *Waste and Resource Management*. 2012, **165**(3), 133-140.
- THOMPSON, R. C. et al. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*. 2004, **304**(5672), 838-838.
- TOKIWA, Y. et al. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(9), 3722-3742.
- URBANSKI, J. *Handbook of analysis of synthetic polymers and plastics: Ellis Horwood series in analytical chemistry*. New York: Halsted Press, 1977. ISBN 978-0470150818.
- URGUN-DEMIRTAS, M., D. SINGH a Krishna PAGILLA. Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 2007, **92**(8), 1599-1610.
- VARMA, A. J., J. F. KENNEDY a P. GALGALI. Synthetic polymers functionalized by carbohydrates: a review. *Carbohydrate Polymers*. 2004, **56**(4), 429-445.
- ZIA, K. M., H. N. BHATTI a I. A. BHATTI. Methods for polyurethane and polyurethane composites, recycling and recovery: A review. *Reactive and Functional Polymers*. 2007, **67**(8), 675-692.
- Plastics-the Facts 2015. *PlasticsEurope* [online]. Busel: PlasticsEurope, 2015a [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2015.aspx>
- Plastics-the Facts 2014. *PlasticsEurope* [online]. Brusel: PlasticsEurope, 2015b [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2014.aspx>

Přílohy

Příloha 1: Nastříhané vzorky PURů

Příloha 2: Mísení vzorků s půdou

Příloha 3: Připravené skleněné láhve pro vložení kádinek s KOH

Příloha 4: Umístění lahví do termoboxu

Příloha 5: Separované materiály po 150denní biodegradaci

Příloha 6: Pipetování vzorků do mikrodestičky pro měření optické hustoty

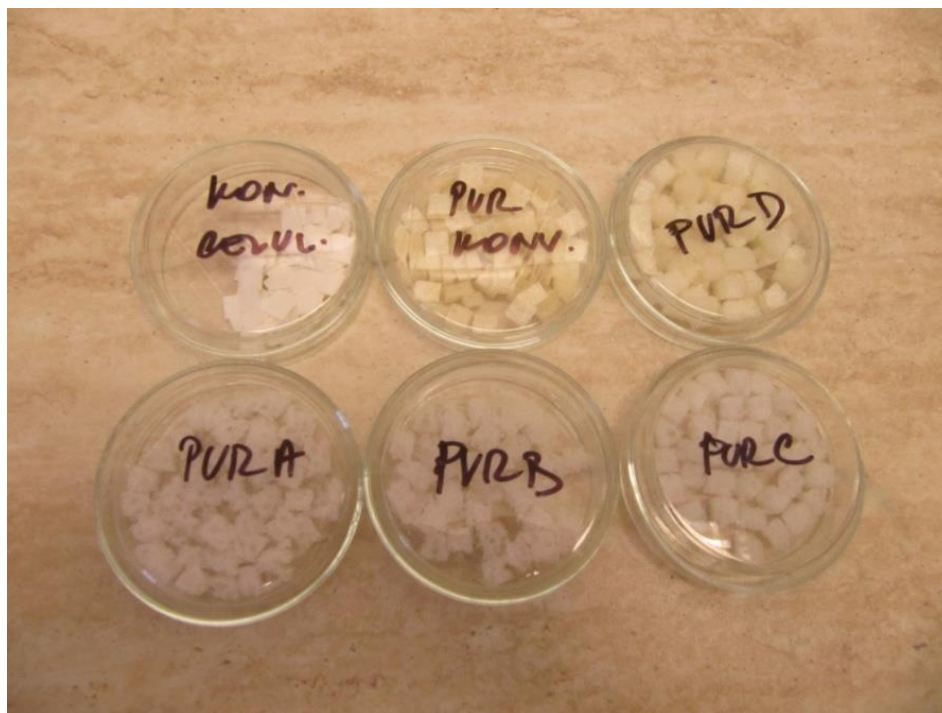
Příloha 7: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-K

Příloha 8: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-B₁

Příloha 9: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-B₂

Příloha 10: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-1

Příloha 11: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-2



Příloha 1: Nastříhané vzorky PURů

(foto Mgr. Kateřina Jandová, Ph.D.)



Příloha 2: Mísení vzorků s půdou
(foto Mgr. Kateřina Jandová, Ph.D.)



Příloha 3: Připravené skleněné láhve pro vložení kádinek s KOH
(foto Mgr. Kateřina Jandová, Ph.D.)



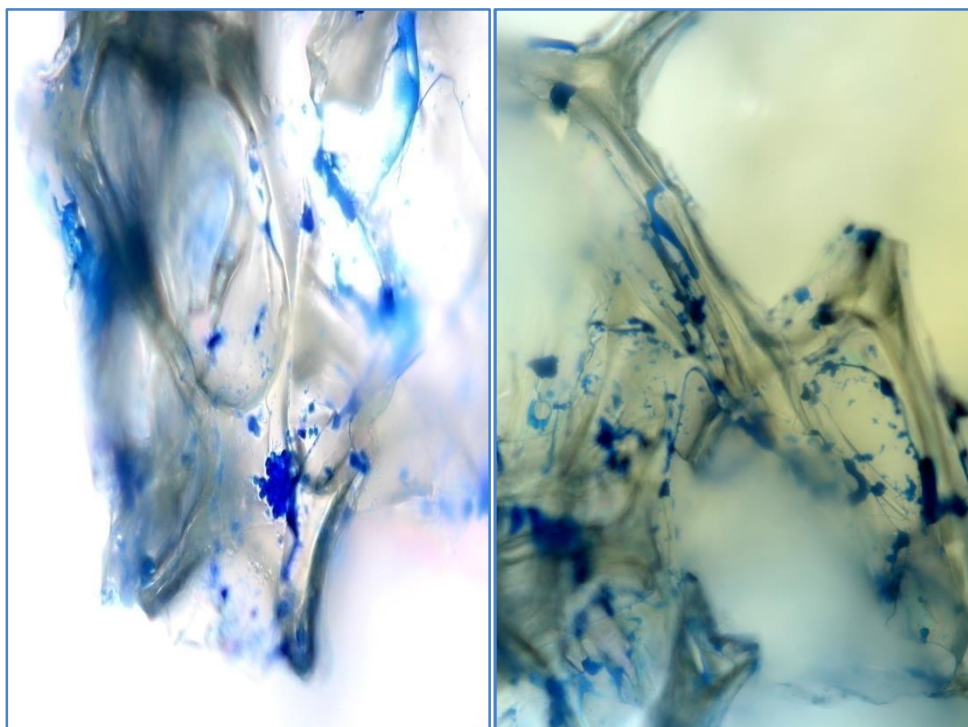
Příloha 4: Umístění lahví do termoboxu
(foto Mgr. Kateřina Jandová, Ph.D.)



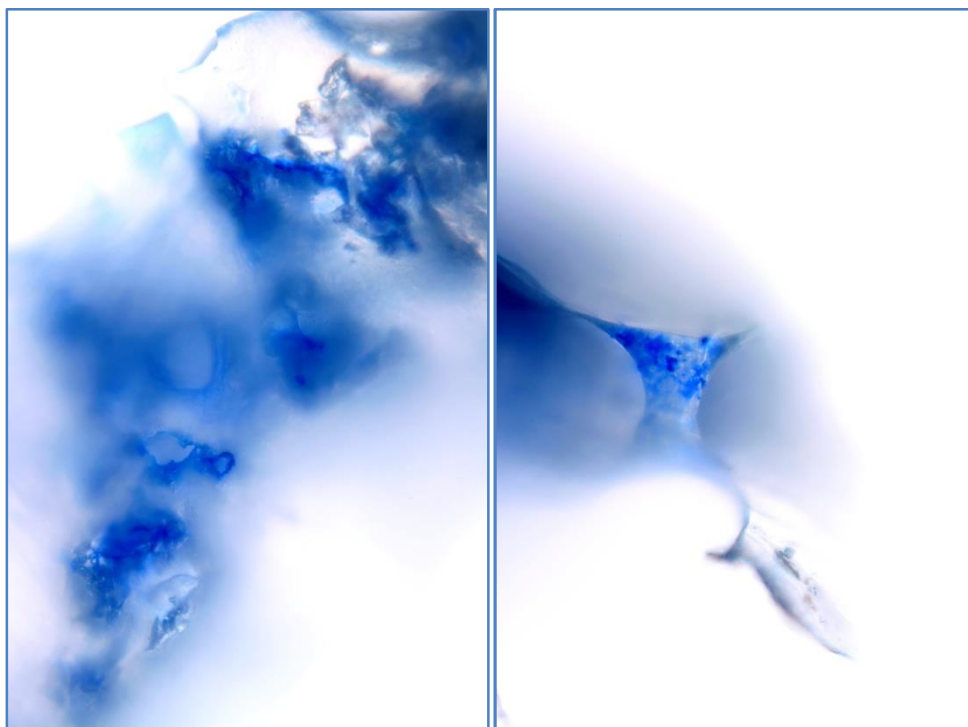
Příloha 5: Separované materiály po 150denní biodegradaci
(foto RNDr. Petra Innemanová, Ph.D.)



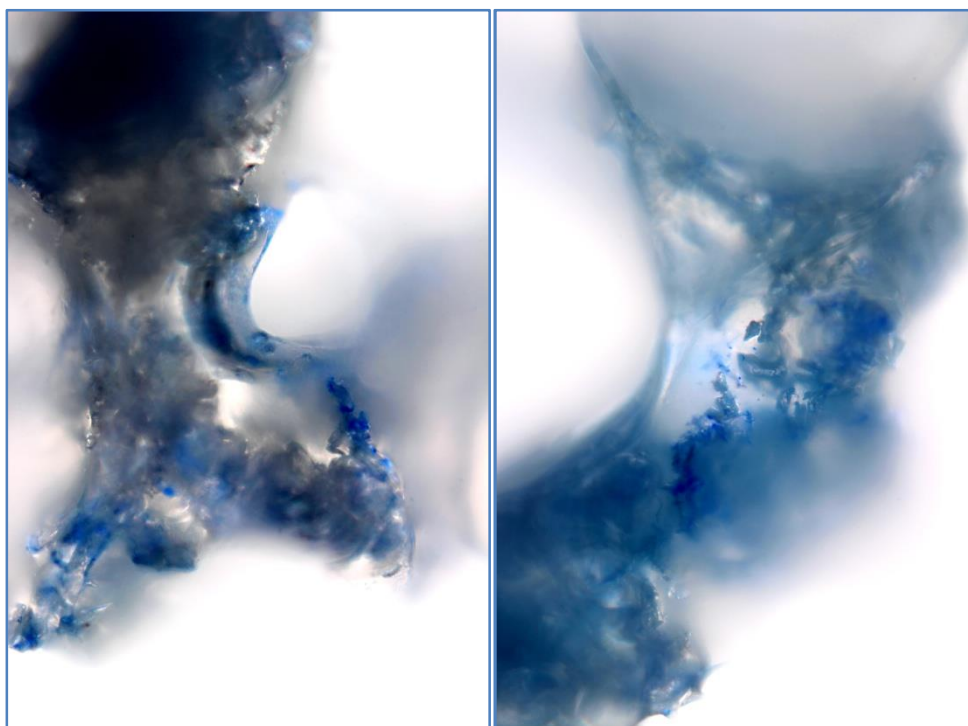
Příloha 6: Pipetování vzorků do mikrodestičky pro měření optické denszity
(foto Kateřina Tošovská)



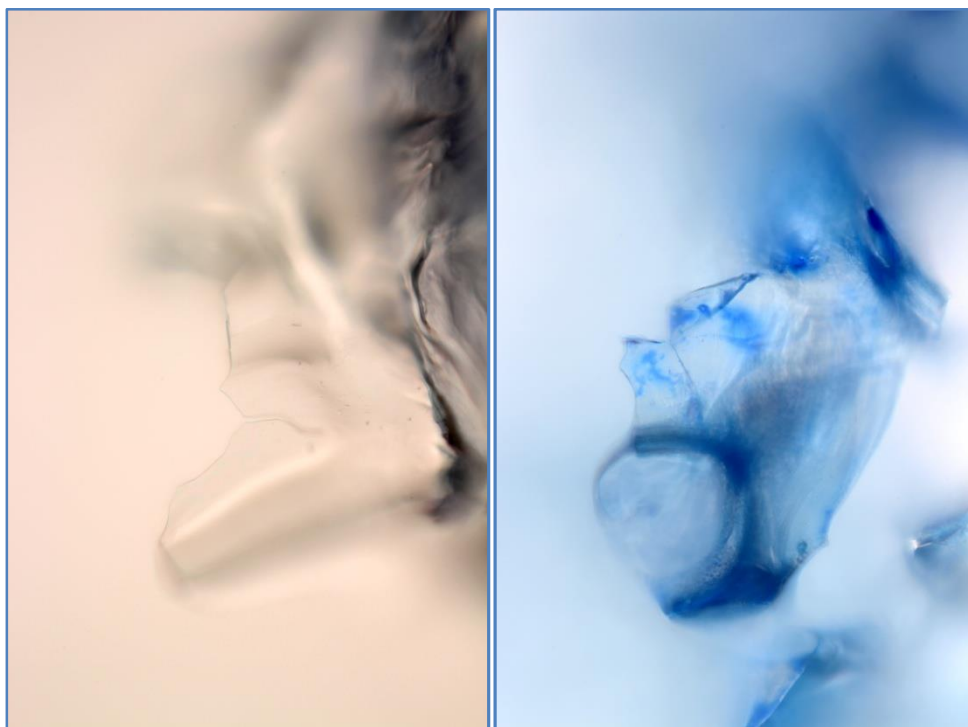
Příloha 7: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-K
(foto Bc. Kateřina Staňková, VŠCHT)



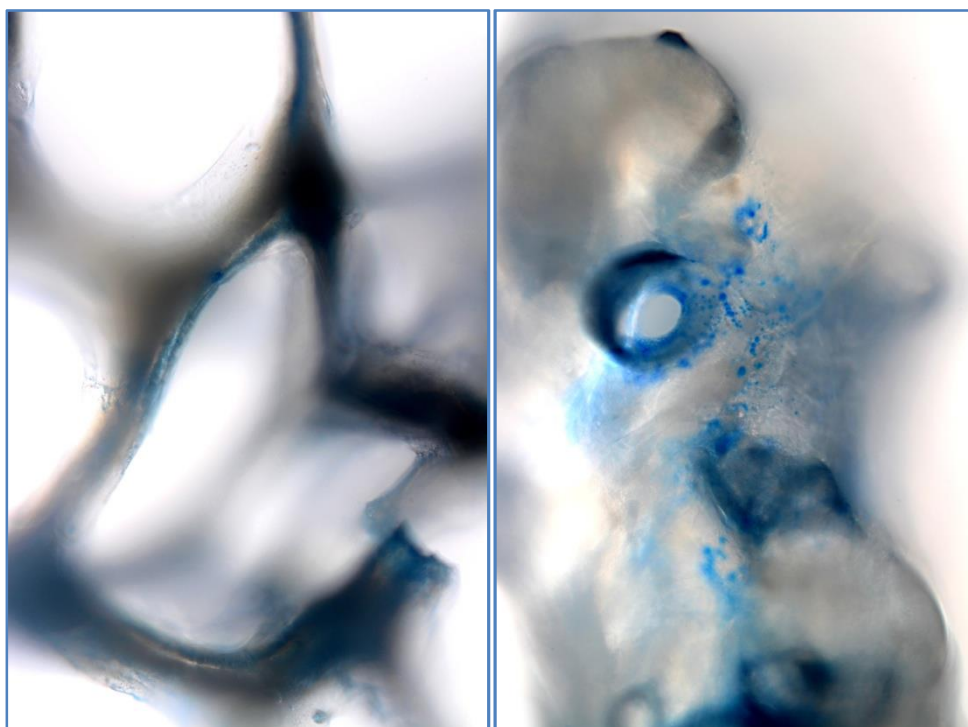
Příloha 8: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-B₁
(foto Bc. Kateřina Staňková, VŠCHT)



Příloha 9: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-B₂
(foto Bc. Kateřina Staňková, VŠCHT)



Příloha 10: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-1
(foto Bc. Kateřina Staňková, VŠCHT)



Příloha 11: Nárůst biofilmu (barveno inkoustem, zvětšení 40x), PUR-2
(foto Bc. Kateřina Staňková, VŠCHT)